

PCT/JPO 3/07630  
Rec'd PCT/PTO 17 DEC 2004  
16.06.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

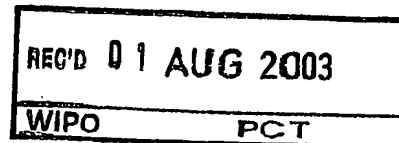
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 6月17日

出願番号  
Application Number: 特願2002-176368  
[ST. 10/C]: [JP 2002-176368]

出願人  
Applicant(s): アークレイ株式会社

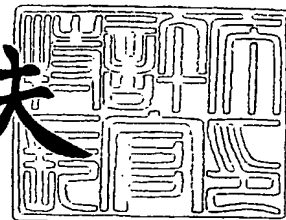


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特 2003-3056714

【書類名】 特許願

【整理番号】 P14-194617

【提出日】 平成14年 6月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/26  
G01N 27/327

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素を用いたグルコース濃度測定方法

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 山岡 秀亮

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 星島 光博

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 辻本 朋吾

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086380

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 稔

【連絡先】 06-6764-6664

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100103078

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 達也

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105832

【弁理士】

【氏名又は名称】 福元 義和

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100117167

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩谷 隆嗣

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100117178

【弁理士】

【氏名又は名称】 古澤 寛

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 024198

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0103432

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素を用いたグルコース濃度測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素と電子伝達物質とを含む反応系を利用してグルコース濃度を測定する方法であって、

前記酵素として、チトクロムCが結合されたグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴とする、グルコース脱水素酵素を用いたグルコース濃度測定方法。

【請求項2】 前記チトクロムCは、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものである、請求項1に記載のグルコース濃度測定方法。

【請求項3】 前記チトクロムCは、還元条件化でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約43kDaである、請求項1または2に記載のグルコース濃度測定方法。

【請求項4】 酵素と電子伝達物質とを含む反応系を利用してグルコース濃度を測定する方法であって、

前記酵素として、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するグルコース脱水素酵素を使用し、

前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴とする、グルコース脱水素酵素を用いたグルコース濃度測定方法。

【請求項5】 前記反応系に対して刺激を与える一方で、この刺激に対する応答を測定し、この応答の量に基づいてグルコース濃度を演算する、請求項1ないし4のいずれかに記載のグルコース濃度測定方法。

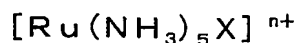
【請求項6】 前記グルコース脱水素酵素は、グルコース脱水素酵素活性を有し、かつ還元条件化でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約60kDaである $\alpha$ サブユニットを有している、請求項1ないし5のいずれかに記載のグルコース濃度測定方法。

【請求項7】 前記グルコース脱水素酵素は、還元条件化でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約14kDaである $\gamma$ サブユニットを有している、請求項1ないし6のいずれかに記載のグルコース濃度測定方

法。

【請求項 8】 前記 Ru 化合物は、下記化学式 1 に示す錯体である、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のグルコース濃度測定方法。

【化 1】



化学式 1 における X は、 $\text{NH}_3$  またはハロゲンイオンであり、 $n+$  は、X の種類によって決定される Ru 錯体の価数を示している。

【請求項 9】 基板と、この基板上に形成された第 1 および第 2 電極と、酵素および電子伝達物質を含んだ試薬層と、を備え、上記試薬層に対してグルコース溶液を供給して反応系を構築するとともに、この反応系に対して上記第 1 および第 2 電極を利用して刺激を与えるように構成されたグルコースセンサであって、

前記酵素として、チトクロム C が結合されたグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru 化合物を使用したことを特徴とする、グルコースセンサ。

【請求項 10】 前記チトクロム C は、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものである、請求項 9 に記載のグルコースセンサ。

【請求項 11】 前記チトクロム C は、還元条件化での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約 43 kDa である、請求項 9 または 10 に記載のグルコースセンサ。

【請求項 12】 基板と、この基板上に形成された第 1 および第 2 電極と、酵素および電子伝達物質を含んだ試薬層と、を備え、前記試薬層に対してグルコース溶液を供給して反応系を構築するとともに、この反応系に対して前記第 1 および第 2 電極を利用して刺激を与えるように構成されたグルコースセンサであって、

前記酵素として、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来のグルコース脱水素酵素を使用し、

前記電子伝達物質として、Ru 化合物を使用したことを特徴とする、グルコースセンサ。

【請求項 1 3】 前記グルコース脱水素酵素は、グルコース脱水素酵素活性を有し、かつ還元条件化での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約 6 0 k D a である  $\alpha$  サブユニットを有している、請求項 1 2 に記載のグルコースセンサ。

【請求項 1 4】 前記グルコース脱水素酵素は、還元条件化での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量が約 1 4 k D a である  $\gamma$  サブユニットを有している、請求項 9 ないし 1 3 のいずれかに記載のグルコースセンサ。

【請求項 1 5】 前記 R u 化合物は、下記化学式 2 に示す錯体である、請求項 9 ないし 1 4 のいずれかに記載のグルコースセンサ。

【化 2】



化学式 2 における X は、 $N H _ 3$  またはハロゲンイオンであり、 $n +$  は、X の種類によって決定される R u 錯体の価数を示している。

【請求項 1 6】 前記基板上には、その内部に前記試薬層が設けられ、かつ試料液を保持するための液保持空間が形成されており、

前記試薬層は、固層として構成されているとともに、前記液保持空間に試料液を保持した状態では、前記酸化還元酵素および電子伝達物質の少なくとも一部は、前記試料液に溶解するように構成されている、請求項 9 ないし 1 5 のいずれかに記載のグルコースセンサ。

【請求項 1 7】 前記液保持空間の容量は、0. 1 ~ 0. 5  $\mu$  L である、請求項 1 6 に記載のグルコースセンサ。

【請求項 1 8】 前記試薬層における酵素の含有量は、グルコース脱水素活性 1. 0 ~ 1 0. 0 U に相当する量である、請求項 1 6 または 1 7 に記載のグルコースセンサ。

【請求項 1 9】 前記試薬層における電子伝達物質の含有量は、前記液保持空間が試料液で満たされたときの電子伝達物質の濃度に換算して 1. 0 ~ 5. 0 w t % に相当する量である、請求項 1 8 に記載のグルコースセンサ。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本願発明は、試料液（たとえば血液などの生化学的試料またはこれの調整液）のグルコース濃度を測定するための技術に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

糖尿病患者にとっては、血糖値を管理するために日頃から自己の血糖値を把握しておくことは重要である。その一方、頻繁に医療機関に足を運ぶのが煩わしことから、患者自身が簡易に血糖値の測定を行え、しかも出先などでも血糖値の測定を手軽に行えるように、手のひらに納まるようなサイズの携帯型の簡易血糖値測定装置が用いられている。

## 【0003】

携帯型の簡易血糖値測定装置を使用する場合には、酵素反応場を提供するグルコースセンサを血糖値測定装置に装着し、グルコースセンサに対して血液（検体）を供給することにより血糖値の測定が行われる。この場合、測定者の皮膚を切開して血液を採取し、この血液を試料液としてグルコースセンサに供給する方法が一般的に採用されている。この方法では、血液採取に対する測定者への負担を小さくする観点からは、採取すべき血液量が少ないほうが好ましいため、検体量の低減のために様々な改良が検討されている。

## 【0004】

グルコースセンサは、たとえば基板上に電極および試薬層を形成するとともに、この試薬層を内部に収容した格好でキャピラリーを設けた構成とされる（図2および図3参照）。試薬層は、酸化還元酵素と電子伝達物質を含んだものとして構成されるが、酸化還元酵素としてはGODやPQQGDHが、電子伝達物質としてはフェリシアン化カリウムが汎用されている。このグルコースセンサでは、キャピラリーを利用して試薬層に検体が供給されたときに、キャピラリー内に液相の反応系が構築される。このとき、酸化還元酵素によって、たとえばグルコースの酸化反応が触媒される一方で、電子伝達物質の還元反応が触媒される。

## 【0005】

これに対して、簡易型血糖値測定装置においては、たとえばアンペロメトリー法が採用され、グルコースセンサの電極を利用して、反応系に対して電圧を印加することにより応答電流値が測定される。この応答電流値は、たとえば還元型の電子伝達物質の量（グルコース濃度に相関する量）に起因するものであり、グルコース濃度を演算する際の基礎とされるものである。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

GODは、グルコースとの反応速度が小さい（ $K_m$ （ミカエリス定数）が大きい）ため、全てのグルコースを反応させてから演算用の応答電流値を取得する方法（エンドポイント法）では測定時間が著しく長くなってしまふ。そのため、GODを使用してアンペロメトリックにグルコース濃度を測定する場合には、一部のグルコースについて一定量ずつ反応させ、演算用の応答電流値を取得する方法（レート法）が広く採用されている。レート法では、グルコース濃度に応じた一定量ずつの反応速度を測定するため、反応系中のグルコース速度をほとんど変化させないように、使用する酵素量を少なくする必要がある。その場合、検体量が少なくなれば、単位時間当たりの反応生成物の量が少なくなり、血糖値測定装置において測定される応答電流値も小さくなる。その結果、GODを使用する方法では、微量検体を用いて、レート法によりグルコース濃度を測定するのが困難となる。また、酵素のグルコースに対する $K_m$ 値を用いてグルコース濃度を定量するレート法では、グルコース高濃度領域での分解能が低くなる。その結果、GODを使用する方法では、微量検体量を測定する場合には、精度良く測定できる濃度範囲（測定レンジ）が小さくなってしまふ。

#### 【0007】

さらに、GODは、電子伝達物質との反応性もさほど大きくない。そのため、この観点からも、測定速度を短くするためには、電子伝達物質を多量に用いる必要がある。その結果、グルコースセンサ（正確には試薬層やキャピラリ）の小型化が困難となり、これに応じて必要な検体量も多くなる。この点からも、GODを使用する方法は微量検体を測定するのに不向きであるといえる。

#### 【0008】



これらの事情からすれば、GODを使用するレート法を採用したアンペロメトリック法では、精度良くグルコースを測定できる検体量は、最小で $0.6\mu\text{L}$ 、測定時間にして最小で15秒、測定レンジにしてグルコース濃度が $10\sim600\text{mg/dL}$ の範囲が限界であるといわれている。

#### 【0009】

その一方で、酸化還元酵素としてPQQGDHを採用した場合には、クーロメトリー法（電量測定法）を採用すれば、 $0.3\mu\text{L}$ の微量検体でも血糖値を測定することが可能となる。ところが、クーロメトリー法は検体中の殆ど全てのグルコースを反応させてからグルコース濃度を演算する方法（積分法）であるため、検体の濃度によって必要測定時間が長短するばかりか、アンペロメトリー法に比べて、グルコース高濃度域では相対的に測定時間が長くなる傾向にある。たとえば、実用上必要とされる最低限の測定レンジ（ $10\sim600\text{mg/dL}$ ）を確保するためには、測定時間を15～30秒は確保する必要がある。

#### 【0010】

このような不具合を考慮した場合、微量検体であっても測定時間を短くできるように、試薬層における酵素や電子伝達物質の含有量を多くすることも考えられるが、この場合、試薬層の溶解性が悪化するために、検体供給時において均一な液相の反応系を構築するのが困難となる。そのため、グルコースセンサ毎（測定毎）の溶解の程度の差に起因して再現性が悪化したり、血液中の血球成分の影響を受けやすくなるなどして、測定精度が悪化するといった問題が生じる。とくに、フェリシアン化カリウムは血液に対する溶解性が小さいため、電子伝達物質としてフェリシアン化カリウムを使用する場合には、測定精度の悪化が顕著となる。また、フェリシアン化カリウムは、保存安定性が悪く、容易に還元体へと移行するため、含有量が多くなるとバックグラウンドの増大につながり、今度はグルコース低濃度域の測定精度が低下する。

#### 【0011】

本願発明は、上述した事情のもとに考え出されたものであって、測定レンジを大きく確保しつつも、短時間かつ精度良く、微量検体を測定できるようにすることをその課題としている。

## 【0012】

## 【発明の開示】

上記した課題を解決すべく、本願発明では次の技術的手段を講じている。

## 【0013】

すなわち、本願発明の第1の側面に係るグルコース濃度測定方法は、酵素と電子伝達物質とを含む反応系を利用してグルコース濃度を測定する方法であって、前記酵素として、チトクロムCが結合されたグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴としている。

## 【0014】

本願発明の第2の側面においては、酵素と電子伝達物質とを含む反応系を利用してグルコース濃度を測定する方法であって、前記酵素として、ブルクホルデリア属由来のグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴とする、グルコース脱水素酵素を用いたグルコース濃度測定方法が提供される。

## 【0015】

本願発明に係るグルコース濃度測定方法では、たとえば反応系に対して刺激を与える一方で、この刺激に対する応答を測定し、この応答の量に基づいてグルコース濃度が演算される。この場合、刺激は、たとえば電圧として与えられ、応答は、電流あるいは光学的特性として得られる。

## 【0016】

本願発明の第3の側面においては、基板と、この基板上に形成された第1および第2電極と、酵素および電子伝達物質を含んだ試薬層と、を備え、上記試薬層に対してグルコース溶液を供給して反応系を構築するとともに、この反応系に対して上記第1および第2電極を利用して刺激を与えるように構成されたグルコースセンサであって、前記酵素として、チトクロムCが結合されたグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用したことを特徴とする、グルコースセンサが提供される。

## 【0017】

本願発明の第4の側面においては、基板と、この基板上に形成された第1およ

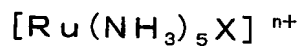
び第2電極と、酵素および電子伝達物質を含んだ試薬層と、を備え、上記試薬層に対してグルコース溶液を供給して反応系を構築するとともに、この反応系に対して上記第1および第2電極を利用して刺激を与えるように構成されたグルコースセンサであって、前記酵素として、ブルクホルデリア属由来のグルコース脱水素酵素を使用し、前記電子伝達物質として、Ru化合物を使用したことを特徴とする、グルコースセンサが提供される。

【0018】

本願発明では、Ru化合物として、たとえば下記化学式3に示す錯体を使用することができる。

【0019】

【化3】



【0020】

化学式3におけるXとしては、NH<sub>3</sub>、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、またはH<sub>2</sub>Oが挙げられる。例示したもののうち、XがNH<sub>3</sub>またはハロゲンイオンであるRu錯体を使用するのが好ましい。一方、化学式3におけるn+は、Xの種類によって決定されるRu錯体の価数を示している。

【0021】

Ru錯体は、還元型(II)が不安定なために通常は酸化型(III)として存在する。そのため、たとえばグルコースセンサの試薬層に酸化型のRu錯体を混在させた状態で光や水に曝露されたとしても、容易には還元されない。また、Ru錯体は結晶化しにくく、微粉末状態を適切に維持することができるといった特性をも有している。この点からは、Ru錯体は溶解性が高いといえる。したがって、曝露耐性や保存安定性などを考慮した場合、試薬層に対しては、酸化型としてRu錯体を含ませるのが好ましい。

【0022】

本願発明のグルコースセンサは、たとえば基板上には、その内部に試薬層が設けられ、かつ試料液を保持するための液保持空間が形成されたものとされる。この場合、試薬層は、固層として構成されているとともに、液保持空間に試料液を

保持した状態では、酸化還元酵素および電子伝達物質の少なくとも一部は、試料液に溶解するように構成される。つまり、グルコースセンサは、試料供給後においては、液保持空間内において、グルコース、酸化還元酵素および電子伝達物質により液相として反応系が構築されるように構成するのが好ましい。

#### 【0023】

液保持空間の容量は、微量試料液を測定できるように、たとえば0.1～0.5  $\mu$ Lに設定される。この場合、試薬層における酸化還元酵素の含有量は、たとえばグルコース脱水素活性1.0～10.0 Uに相当する量とされる。一方、試薬層における電子伝達物質の含有量は、たとえば液保持空間が試料液で満たされたときの電子伝達物質の濃度に換算して1.0～5.0 wt %に相当する量とされる。

#### 【0024】

本願発明でいうブルクホルデリア属に属する微生物は、グルコース脱水素活性を有する $\alpha$ サブユニット、またはチトクロムC ( $\beta$ サブユニット)を含む酵素(以下、単に「GDH」ということがある)を産出できるものであれば特に限定されないが、その中でもブルクホルデリア・セバシア、とくにブルクホルデリア・セバシアKS1株(以下、単に「KS1株」ということがある)が好ましい。KS1株は、温泉付近の土壌から分離した新規菌株であるが、その菌学的性質からブルクホルデリア・セバシアであると同定されており、平成12年9月25日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。KS1株は、 $\alpha$ サブユニット(分子量約60 kDa)、 $\beta$ サブユニット(チトクロムCに相当)(分子量約43 kDa)および $\gamma$ サブユニット(分子量約14 kDa)を含むGDHを産出することができる。ただし、分子量は、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において測定したものである。

#### 【0025】

チトクロムC ( $\beta$ サブユニットを含む)は、電子伝達タンパク質であり、電子伝達速度を向上させる観点からは、グルコース脱水素酵素活性を有するサブユニ

ット ( $\alpha$ サブユニットを含む) に対して、チトクロムCを結合させた形で、GDH (以下、単に「CyGDH」ということがある) として使用するのが好ましい。チトクロムCは、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するもの ( $\beta$ サブユニット) に限らず、グルコース脱水素酵素活性を有するサブユニットに結合し、電子伝達機能を発揮できる限りにおいては、他の微生物や生体細胞に由来するものであってもよい。ただし、 $\alpha$ サブユニットに $\beta$ サブユニットを結合させたGDHでは、グルコースとの反応速度が小さくなることが本願発明者らによって確認されているため、GDHにチトクロムCを含ませる否かは、反応系の組成 (たとえばグルコースと電子伝達物質の比率や電子伝達物質の能力)、測定目的などに応じて、適宜検討すればよい。

#### 【0026】

$\alpha$ サブユニットは、既述のようにグルコース脱水素酵素活性を有するものである。 $\alpha$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットとからなるGDH (以下、単に「 $\alpha$ GDH」ということがある) は、 $\gamma$ サブユニットを有しないGDHに比べて、グルコースとの反応速度が大きい ( $K_m$ が小さい)。この点については、本願発明者らによって確認されている。したがって、グルコースとの反応速度を大きくする観点からは、 $\alpha$ サブユニットを使用する場合には、 $\alpha$ サブユニットに対して $\gamma$ サブユニットを結合させた形で、GDHとして使用するのが好ましい。

#### 【0027】

$\alpha$ サブユニットは、配列番号3のアミノ酸番号2～12のアミノ酸配列を含んでいる。もちろん、グルコース脱水素活性を有する限りは、アミノ酸残基の一部が、置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有していてもよい。一方、 $\gamma$ サブユニットは、 $\alpha$ サブユニットと組み合わせることもより、グルコースとの反応速度を大きくさせるものであるが、 $\gamma$ サブユニットの機能については、現段階では明確には確認されていない。

#### 【0028】

なお、本願の特許請求の範囲においては、由来菌により $\alpha$ サブユニット、チトクロムC ( $\beta$ サブユニット) あるいは $\gamma$ サブユニットを特定することがあるが、これは各サブユニットを特定するための便法に過ぎない。すなわち、目的とするサ

ブユニットの発現コードを含むベクターを宿主に移入し、この宿主から産出されるGDHをグルコース脱水素酵素として使用する場合であっても、相違点がGDH（サブユニット）の起源のみしかないときには、本願発明の技術的範囲に属することを念のためにここで確認しておく。

#### 【0029】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本願発明の好ましい実施の形態について、図面を参照して具体的に説明する。

#### 【0030】

図1に示した濃度測定装置1は、本願発明に係るグルコースセンサ2を用いて、血液などのグルコースを含む試料液中のグルコース濃度を測定するためのものであり、電圧印加部3、電流値測定部4、検知部5、制御部6、演算部7および表示部8を備えて大略構成されている。

#### 【0031】

グルコースセンサ2は、使い捨てとして構成されたものであり、図2および図3に良く表れているように、カバー板20、スペーサ21および基板22を有している。

#### 【0032】

カバー板20には穴部23が設けられており、スペーサ21には穴部23に連通するとともに先端部24aが開放した細幅なスリット24が設けられている。カバー板20およびスペーサ21が基板22の上面22aに積層された状態では、スリット24によりキャピラリ25が形成されている。このキャピラリ25は、その容量が、たとえば0.1～0.5 $\mu$ Lに設定されており、スリット24の先端開口部24aおよび穴部23を介して外部と連通している。先端開口部24aは試料液導入口25aを構成しており、この試料液導入口25aから供給された試料液は、毛細管現象により穴部23に向けてキャピラリ25内を進行する。

#### 【0033】

基板22の上面22aには、第1電極26、第2電極27、および試薬層28

が設けられている。

#### 【0034】

第1および第2電極26, 27は、全体として基板22の長手方向に延びており、それらの一端部26A, 27Aが基板22の短手方向に延びている。基板22の上面22aは、第1および第2電極26, 27の一端部26a, 27aおよび他端部26b, 27bが露出するようにして絶縁膜29により覆われている。第1および第2電極26, 27の他端部26b, 27bは、端子部を構成している。

#### 【0035】

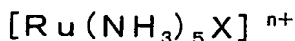
試薬層28は、たとえば固形状であり、第1および第2電極26, 27の他端部26a, 27a間を橋渡すようにして設けられている。この試薬層28は、たとえば相対的に多量の酸化型のRu化合物（電子伝達物質）および相対的に少量のGDH（グルコース脱水素酵素）を含んでいる。試薬層におけるGDHの含有量は、たとえばグルコース脱水素活性1.0～10.0Uに相当する量とされ、試薬層におけるRu化合物の含有量は、たとえばキャピラリ25が試料液で満たされたときのRu化合物の濃度に換算して1.0～5.0wt%に相当する量とされる。

#### 【0036】

酸化型のRu化合物は、電子伝達体として機能すればよいが、たとえば下記化学式4で示されるものを使用するのが好ましい。

#### 【0037】

#### 【化4】



#### 【0038】

化学式4におけるXとしては、NH<sub>3</sub>、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、またはH<sub>2</sub>Oが挙げられる。例示したもののうち、XがNH<sub>3</sub>またはハロゲンイオンであるRu錯体を使用するのが好ましい。一方、化学式4におけるn+は、Xの種類によって決定されるRu錯体の価数を示している。

#### 【0039】

試薬層 28 では、GDH に対して、Ru 化合物の比率が大きくされており、試薬層 28 の溶解性に対しては Ru 化合物の溶解性が与える影響は大きい。その一方で、Ru 化合物として例示した Ru 錯体（化学式 4）は、結晶化しにくく、微粉末の状態を適切に維持でき、溶解性の高いものである。したがって、試薬層 28 は、全体として溶解性が高く、血液の供給によって容易に溶解するものとされている。そのため、グルコースセンサ 2 では、キャピラリ 25 の容積を上述した範囲のように小さく設定したとしても、血液が供給されたときに、キャピラリ 25 内において略均一な液相の反応系を構築することができるようになる。

#### 【0040】

一方、GDH としては、グルコース脱水素活性を有するサブユニットに対して電子伝達たんぱく質であるチトクロム C を結合させたものを使用するのが好ましい。グルコース脱水素活性を有するサブユニットやチトクロム C は、たとえばブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものを使用するのが好ましい。もちろん、グルコース脱水素活性を有するサブユニットやチトクロム C は、ブルクホルデリア属に属する微生物に限らず、目的とする機能が発揮できる範囲において他の微生物や生体細胞に由来するものであってもよいし、目的とするサブユニットの発現コードをブルクホルデリア属に属する微生物から取得するとともに、この発現コードを含むベクターを宿主に移入し、この宿主から産出させたものであってもよい。

#### 【0041】

微生物としてブルクホルデリア属に属する KS 1 株を用いる場合には、グルコース脱水素活性を有するサブユニットは  $\alpha$  サブユニット（分子量約 60 kDa）として得られ、チトクロム C は  $\beta$  サブユニット（分子量約 43 kDa）として得られる。この KS 1 株では、 $\alpha$  サブユニットおよび  $\beta$  サブユニットに対して、 $\gamma$  サブユニット（分子量約 14 kDa）が結合した GDH が産出される。ただし、分子量は、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において測定したものである。この場合、グルコースとの反応速度を大きくする観点からは、 $\alpha$  サブユニットに対して  $\gamma$  サブユニットを結合させた  $\alpha$  GDH を使用するのが好ましい。一方、電子伝達速度を向上させる観点からは、 $\alpha$  GDH に対して  $\beta$  サ



ブユニット（チトクロム C）を結合させた CyGDH を使用するのが好ましい。

#### 【0042】

図 1 に示した電圧印加部 3 は、第 1 電極 26 の端子部 26b と第 2 電極 27 の端子部 27b との間に定電圧を印加するものである。電圧印加部 3 は、グルコースセンサ 2 をグルコース濃度測定装置 1 に設けられた装着部（図示略）に装着することにより、第 1 および第 2 接触子 3a, 3b を介して、グルコースセンサ 2 の端子部 26b, 27b と導通するようになっている。電圧印加部 3 としては、たとえば乾電池や充電電池などの直流電源が使用される。

#### 【0043】

電流値測定部 4 は、反応系に対する電圧印加時に、たとえば還元型の Ru 化合物から放出された電子の量に相関する応答電流値を測定するものである。

#### 【0044】

検知部 5 は、グルコース濃度測定装置 1 にグルコースセンサ 2 が装着された後において、試薬層 28 に試料液が供給され、グルコース濃度の測定が可能になったか否かを検知するものである。

#### 【0045】

制御部 6 は、電圧印加部 3 を制御し、第 1 および第 2 電極 26, 27 の間に電圧が印加される状態（閉回路）と印加されない状態（開回路）とを選択するものである。

#### 【0046】

演算部 7 は、電流値測定部 4 により測定された応答電流値に応じて、試料液中のグルコース濃度の演算を行うものである。

#### 【0047】

なお、検知部 5、制御部 6 および演算部 7 のそれぞれは、たとえば CPU および ROM や RAM などのメモリにより構成されるが、検知部 5、制御部 6 および演算部 7 の全てを、1 つの CPU に対して複数のメモリを接続することにより構成することもできる。また、演算部 7 による演算結果は、表示部 8 により表示される。表示部 8 は、たとえば LCD などにより構成される。

#### 【0048】

次に、試料液中のグルコース濃度測定の手順を図 1 ないし図 3 に加えて、図 4 をも参照しつつ説明する。

#### 【0049】

図 1 に良く表れているように、まずグルコース濃度測定装置 1 にグルコースセンサ 2 をセットする。そうすると、グルコースセンサ 2 の第 1 電極 26 の端子部 26b が濃度測定装置 1 の第 1 接触子 3a と接触し、第 2 電極 27 の端子部 27b が第 2 接触子 3b と接触する。先にも触れたように、この状態では第 1 および第 2 電極 26, 27 が電圧印加部 3 に導通可能とされている。実際の測定においては、グルコースセンサ 2 に試料液を供給する以前から、制御部 6 の制御に基づいて、電圧印加部 3 により第 1 および第 2 電極 26, 27 間に定電圧が印加されている。定電圧は、たとえば 100～500 mV の範囲に設定される。

#### 【0050】

次いで、グルコースセンサ 2 の試料液導入口 25a を介して血液などの試料液を供給する。試料液は、毛細管現象によりグルコースセンサ 2 のキャピラリ 25 内を進行する。その過程において、試料液により試薬層 28 が溶解されて、液相の反応系が構築される。反応系においては、たとえば GDH によりグルコースが酸化されるとともに Ru 化合物が還元型とされる。

#### 【0051】

2 つの端子部 26b, 27b を介して第 1 および第 2 電極 26, 27 間に定電圧を印加した状態では、試薬層 28 に存在する還元型の Ru 化合物が第 1 電極 26 の一端部 26a 側に移動し、この一端部 26a に電子を放出して酸化型の Ru 化合物となる。したがって、電圧印加部 3 により第 1 および第 2 電極 26, 27 間に定電圧を供給した状態では、還元型の Ru 化合物から付与された電子量が第 1 電極 26 および第 1 接触子 3a を介して電流値測定部 4 において応答電流として測定される。

#### 【0052】

一方、電流値測定部 4 において測定された応答電流値は、検知部 5 においてモニタリングされており、図 4 に示したように、応答電流値が閾値  $I_1$  (たとえば  $2 \sim 3 \mu A$ ) を超えた時点  $t_0$  で、検知部 5 は試薬層 28 に試料液が供給され、

試薬層 28 が溶解したことを検知する。

### 【0053】

検知部 5 が試料液が供給されたことを検知した場合には、電流値測定部 4 は、この検知から一定時間（たとえば  $t_2 - t_0$  が 10 秒以下、さらに好ましくは 5 秒以下）の経過時点  $t_2$  における演算用の応答電流値  $I_2$  を測定する。

### 【0054】

なお、図 5 に示したように、検知部 5 において試料液が供給されたことが検知されてから一定時間（たとえば  $t_1 - t_0$  が 10 秒以下、さらに好ましくは 3 秒以下）が経過する時点  $t_1$  まで電圧の印加を一旦中止してもよい。その上で、時点  $t_1$  から電圧を再印加する一方で、この再印加から一定時間（たとえば  $t_2 - t_1$  が 3 秒以上、さらに好ましくは 3 秒～5 秒）が経過する時点  $t_2$  における応答電流値を演算用の応答電流値  $I_2$  として採用してもよい。

### 【0055】

一方、演算部 7 では、演算用の応答電流  $I_2$  に基づいて、試料液中のグルコース濃度を演算する。グルコース濃度の演算は、応答電流値を電圧値に換算した後に、この電圧値を、予め作成しておいた電圧値とグルコース濃度との関係を示す検量線に当てはめることにより演算される。検量線は、たとえばデータ化されて、演算を実行するプログラムとともに ROM に格納されている。

### 【0056】

本実施の形態では、Ru 化合物と、特定の GDH ( $\alpha$ GDH や CyGDH など) と、を組み合わせることで試薬層 28 が構成されている。このような試薬層 28 では、試料液を供給したときの反応速度（酵素反応速度および電子伝達速度の双方を含む）が大きく、たとえば CyGDH では  $K_m$  が約 2 mM である。そのため、グルコース濃度が小さい場合であっても、最大速度でグルコース反応が進行し、単位時間あたりに生成される反応生成物の量はグルコース濃度の大小に関わらず同じとなる。また、グルコース濃度が 1000 mg/dL 程度であっても、コンマ数秒で略全てのグルコースの反応が終了し、検体量が少なくても多くの反応性生物が得られるため、グルコース濃度の大きさに関わらず、短時間でエンドポイントに達することができる。その結果、後述する実施例から明らかとなるが、測定

対象となる試料液（たとえば血液）の量を少なくしつつも、測定時間（図4および図5の  $t_2 - t_0$ ）を短く設定できる。その上、グルコース濃度が大きい微量検体を測定する場合であっても、同一濃度のグルコース濃度を複数回測定した場合における応答電流値のバラツキが小さく、測定レンジの幅も大きく確保できるようになる。

#### 【0057】

また、試薬層28は、上述したようにその溶解性が高いために、試料液の供給時に略均一な液相の反応系を構築することができる。そのため、試料液としての血液（検体）を使用する場合においても、ヘマトクリットの影響をさほど受けずに、再現性良く応答電流値を測定することができる。その結果、微量検体により血糖値を測定する場合であっても、測定精度が悪化することもない。

#### 【0058】

本実施の形態では、グルコースセンサと濃度測定装置との組み合わせにおいて、グルコース濃度の測定方法を説明したが、本願発明に係るグルコース濃度の測定方法は、酵素固定化電極を備えたメータを用いて実現することも可能である。

#### 【0059】

##### 【実施例】

以下においては、酵素反応を利用したグルコース濃度の測定において、Ru錯体と $\alpha$ GDHまたはCyGDHを組み合わせて試薬層を構成したグルコースセンサは、微量検体であっても、反応速度が大きく（測定時間が短く）、測定レンジが広くて再現性に優れ、ヘマトクリット（Hct）の影響を受けにくいことを実証する。

#### 【0060】

（グルコースセンサの作成）

グルコースセンサとしては、基板上に、第1電極、第2電極、試薬層、およびキャピラリーが形成されたもの（図2および図3参照）を使用した。第1および第2電極は、基板上にカーボンインクをスクリーン印刷した後に乾燥させることにより形成した。キャピラリーの容積は、基本的には  $0.3 \mu\text{L}$  に設定した。ただし、検体中のHctの影響については、後述するようにキャピラリーの容積を  $0.4$

$\mu\text{L}$ および $0.5\mu\text{L}$ としたものについても検討した。試薬層は、電子伝達層および酵素含有層からなる2層構造とした。電子伝達層は、基板上に電子伝達物質を含む第1材料液 $0.4\mu\text{L}$ を塗布した後に第1材料液を送風乾燥( $30^\circ\text{C}$ 、 $10\%\text{Rh}$ )することにより形成した。酵素含有層は、電子伝達層上に、酸化還元酵素を含む第2材料液 $0.3\mu\text{L}$ を塗布した後に第2材料液を送風乾燥( $30^\circ\text{C}$ 、 $10\%\text{Rh}$ )することにより形成した。

#### 【0061】

第1材料液は、下記表1の①～④を番号通りの順序で混合した混合液を1～3日放置した後、この混合液に電子伝達物質を添加することにより調製した。第2材料液は、酸化還元酵素を $0.1\%\text{CHAPS}$ に溶解させることにより調製した。

#### 【0062】

電子伝達物質としては、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  (同仁化学研究所製「LM72」) (以下、単に「Ru」あるいは「Ru錯体」という) または $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{III})(\text{CN})_6]$  (ナカライテスク (株) 製「28637-75」) (以下、単に「Ferric」という) を使用し、酸化還元酵素としては、CyGDH、 $\alpha\text{GDH}$ またはPGGDHを使用した。上述したように、CyGDHは、 $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ サブユニットおよび $\gamma$ サブユニットからなり、 $\alpha\text{GDH}$ は、 $\alpha$ サブユニットおよび $\gamma$ サブユニットからなるものである。PQQGDHは、PQQ(ピロロキノリンキノン)を補酵素とするものである。

#### 【0063】

【表1】

第1材料液の組成(電子伝達物質を除く)

①SWN 溶液		②CHAPS 溶液		③蒸留 水	④ACES 溶液	
濃度	容量	濃度	容量		濃度	容量
1.2%	$250\mu\text{L}$	10%	$25\mu\text{L}$	$225\mu\text{L}$	200mM	$500\mu\text{L}$

#### 【0064】

表1などにおいて、SWNはルーセントタイトSWNの略号であり、CHAP

Sは3-[(3-choamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonateの略号であり、ACESはN-(2-acetamido)-2-aminoetanesulfonic acidの略号である。SWNとしてはコープケミカル(株)製「3150」を使用し、CHAPSとしては同仁化学研究所製「KC062」を使用し、ACESとしては同仁化学研究所製「ED067」を使用した。なお、ACES溶液はpHが7.5となるように調製した。

#### 【0065】

(グルコース溶液の調製)

グルコース溶液としては、グルコース濃度およびHct値が目的濃度に調製された全血(検体)を用いた。Hct値は、特段の限定がない限りは42%に調整している。グルコース濃度は、試験目的に応じて、0、101、412、624、820あるいは1034mg/dLに調整した。

#### 【0066】

(応答電流値の測定)

応答電流値は、グルコースセンサの第1および第2電極の間に定電位(200mV)を印加した状態で、試薬層にキャピラリー容積に応じた量(0.3 $\mu$ L、0.4 $\mu$ L、0.5 $\mu$ L)の検体を供給し、この検体供給から特定時間(5秒あるいは10秒)の経過後に測定した。

#### 【0067】

測定レンジの評価:

測定レンジは、種々のグルコース濃度の検体を用いて応答電流値を測定した上で、グルコース濃度を横軸に、応答電流値を縦軸に設定したときのプロット点の直線性から評価した。検体の供給から5秒後の応答電流値に関する結果を図6および図7に、検体の供給から10秒後の応答電流値に関する結果を図8および図9にそれぞれ示した。これらの図においては、各プロット点は、同一構成とされた10個のグルコースセンサについて応答電流値を測定した上で、その平均値として示してある。本評価で使用したグルコースセンサにおいては、酸化還元酵素および電子伝達物質に関しては下記表2に示した通りとした。表2においては、センサ番号A-1~3、B-1~3が本案のグルコースセンサであり、その他は

比較のためのグルコースセンサである。表 2 における酸化還元酵素の活性は、キャピラリーに検体を供給して液相反応系を構成した場合における当該液相反応系での活性を表しており、電子伝達物質の含有量は、上記液相反応系における電子伝達物質の重量比率を表している。

【0068】

【表 2】

センサの構成

センサ番号	酸化還元酵素		電子伝達物質	
	種類	活性 (U)	種類	含有量 (w t %)
A-1or2or3	CyGDH	2	Ru	2or 4or 8
B-1or2or3	$\alpha$ GDH	2	Ru	2or 4or 8
C-1or2or3	PQQGDH	2	Ru	2or 4or 8
D-1or2or3	PQQGDH	20	Ru	2or 4or 8
E-1or2or3	CyGDH	2	Ferri	2or 4or 8
F-1or2or3	$\alpha$ GDH	2	Ferri	2or 4or 8
G-1or2or3	PQQGDH	2	Ferri	2or 4or 8
H-1or2or3	PQQGDH	20	Ferri	2or 4or 8

【0069】

再現性の評価:

再現性は、同一条件下(グルコースセンサの構成および検体の濃度が同一)での測定値のバラツキにより評価した。バラツキは、相対標準偏差(C. V.)により評価した。C. V. は、図 6～図 8 における各プロット点を計算する際の基礎となる 10 個の測定データに基づいて計算した。5 秒値についての結果を表 3 ないし表 5 に、10 秒値についての結果を表 6 ないし表 8 にそれぞれ示した。

【0070】

【表 3】

[再現性] C. V. (%) : (電子伝達物質 8 w t %, 応答電流 5 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-3	Ru8%-Cy2U	6.7	1.2	1.4	3.6	0.7	3.5
B-3	Ru8%- $\alpha$ 2U	9.4	3.5	1.5	1.3	2.5	1.8
C-3	Ru8%-PQQ2U	6.1	11.1	11.9	13.2	8.0	8.8
D-3	Ru8%-PQQ20U	18.1	2.1	0.9	5.0	13.8	7.6
E-3	Ferri8%-Cy2U	5.0	6.7	4.4	2.1	5.3	2.3
F-3	Ferri8%- $\alpha$ 2U	11.1	5.7	4.3	3.3	7.1	3.6
G-3	Ferri8%-PQQ2U	6.0	3.0	7.7	10.6	3.7	9.6
H-3	Ferri8%-PQQ20U	12.9	7.2	2.3	1.9	1.3	2.9

【0071】

【表 4】

[再現性] C. V. (%) : (電子伝達物質 4 w t %, 応答電流 5 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-2	Ru4%-Cy2U	8.9	2.2	1.0	1.9	2.9	3.8
B-2	Ru4%- $\alpha$ 2U	8.9	1.5	3.1	2.3	2.4	6.8
C-2	Ru4%-PQQ2U	12.4	9.2	5.3	14.5	23.1	11.2
D-2	Ru4%-PQQ20U	10.5	1.4	2.8	5.1	6.0	6.1
E-2	Ferri4%-Cy2U	11.0	2.9	1.8	2.2	1.6	2.7
F-2	Ferri4%- $\alpha$ 2U	11.0	10.5	5.4	6.0	28.0	6.3
G-2	Ferri4%-PQQ2U	6.5	6.0	12.5	4.4	8.2	3.9
H-2	Ferri4%-PQQ20U	4.9	8.0	5.8	5.4	9.5	22.9

【0072】



【表 5】

【再現性】 C. V. (%) : (電子伝達物質 2 w t %、応答電流 5 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-1	Ru2%-Cy2U	17.2	2.0	1.0	1.0	2.2	3.7
B-1	Ru2%- $\alpha$ 2U	22.4	1.6	1.8	9.3	7.1	13.0
C-1	Ru2%-PQQ2U	11.1	7.6	23.5	15.8	8.1	32.1
D-1	Ru2%-PQQ20U	8.6	1.8	2.2	6.1	9.0	4.7
E-1	Ferri2%-Cy2U	10.4	2.3	2.0	22.8	37.6	39.1
F-1	Ferri2%- $\alpha$ 2U	15.8	4.7	33.8	36.0	41.4	16.6
G-1	Ferri2%-PQQ2U	5.0	6.9	5.3	10.2	12.7	6.9
H-1	Ferri2%-PQQ20U	6.5	6.4	11.9	8.7	39.2	28.4

【0073】

【表 6】

【再現性】 C. V. (%) : (電子伝達物質 8 w t %、応答電流 10 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-3	Ru8%-Cy2U	6.4	2.2	5.1	4.4	3.0	2.6
B-3	Ru8%- $\alpha$ 2U	10.0	3.2	2.9	3.7	3.5	3.3
C-3	Ru8%-PQQ2U	6.9	7.5	9.4	12.4	6.8	10.6
D-3	Ru8%-PQQ20U	16.0	4.0	2.0	2.5	7.2	3.4
E-3	Ferri8%-Cy2U	4.2	5.9	4.5	3.8	5.7	3.1
F-3	Ferri8%- $\alpha$ 2U	7.4	6.1	6.3	2.4	7.5	4.6
G-3	Ferri8%-PQQ2U	4.5	2.4	6.2	10.5	3.5	9.5
H-3	Ferri8%-PQQ20U	9.7	6.5	1.4	1.9	2.5	3.3

【0074】

【表 7】

[再現性] C. V. (%) : (電子伝達物質 4 w t %、応答電流 10 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-2	Ru4%-Cy2U	10.6	2.0	2.6	2.1	2.1	2.1
B-2	Ru4%- $\alpha$ 2U	10.4	1.5	3.4	2.4	3.0	3.2
C-2	Ru4%-PQQ2U	13.5	5.2	5.1	14.5	21.8	10.7
D-2	Ru4%-PQQ20U	10.4	2.6	2.8	2.6	5.4	4.5
E-2	Ferr i4%-Cy2U	7.0	2.9	2.9	2.1	2.0	2.2
F-2	Ferr i4%- $\alpha$ 2U	6.6	5.5	5.1	6.1	35.8	21.0
G-2	Ferr i4%-PQQ2U	4.1	3.7	9.8	3.7	7.7	4.7
H-2	Ferr i4%-PQQ20U	2.8	3.6	2.1	5.1	4.9	31.2

【0075】

【表 8】

[再現性] C. V. (%) : (電子伝達物質 2 w t %、応答電流 10 秒値)

センサ 番号	試薬層の 組成	グルコース濃度 (mg/dL)					
		0	101	412	624	820	1034
A-1	Ru2%-Cy2U	18.7	3.6	1.5	1.0	1.8	1.7
B-1	Ru2%- $\alpha$ 2U	21.4	2.2	0.9	3.2	28.0	31.8
C-1	Ru2%-PQQ2U	13.0	7.0	22.5	16.7	8.6	30.3
D-1	Ru2%-PQQ20U	12.8	1.3	1.5	2.7	3.9	2.3
E-1	Ferr i2%-Cy2U	6.9	0.9	2.0	27.8	48.3	44.6
F-1	Ferr i2%- $\alpha$ 2U	10.5	3.2	18.8	19.1	39.9	22.9
G-1	Ferr i2%-PQQ2U	3.8	4.2	5.4	8.7	11.9	7.8
H-1	Ferr i2%-PQQ20U	8.4	13.3	14.6	16.5	38.5	30.6

【0076】

検体中の H c t の影響の検討:

H c t の影響は、試薬層の組成が同一の複数のグルコースについて、グルコース濃度が同一で H c t 値が異なる複数の検体を用いて、検体供給から一定時間経過後の応答電流値を測定することにより行った。グルコースセンサとしては、本案センサ 1～3 および比較センサを使用した。本案センサ 1 では、スぺーサの厚みを  $58\text{ }\mu\text{m}$  としてキャピラリ容積（検体量）を  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  に設定し、本案センサ 2 では、スぺーサの厚みを  $44\text{ }\mu\text{m}$  としてキャピラリ容積（検体量）を  $0.4\text{ }\mu\text{L}$  に設定し、本案センサ 3 は、スぺーサの厚みを  $33\text{ }\mu\text{m}$  としてキャピラリ容積（検体量）を  $0.3\text{ }\mu\text{L}$  に設定した。本案センサ 1～3 では、試薬層における C y G D H の含有量を 2.0 U 相当量、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  の含有量を 4 w t %（電子伝達物質の濃度に換算して）とした。一方、比較センサとしては、アークレイ（株）製の簡易血糖測定機グルコカード専用センサを用いた。このセンサは、酸化還元酵素として G O D を、電子伝達物質として F e r i を用いたものである。

#### 【0077】

本案センサ 1～3 を用いたときの結果は図 10（a）～（c）に、比較センサを用いたときの結果は図 10（d）に示した。図 10（a）～（d）においては、H c t 値が 42 % のときの応答電流値を基準とし、この測定値に対するずれ量（B i a s）を縦軸として表してある。図 10（a）～（c）においては横軸を時間、図 10（d）においては横軸を H c t 値として表している。なお、各図における各プロット点は、5 回の測定の平均値として示してあり、図 10（d）におけるプロット点は、検体の供給から 30 秒後の値に基づいて計算したものである。

#### 【0078】

##### 評価結果の考察：

酵素として C y G D H、電子伝達物質として R u 錯体を使用したグルコースセンサ（A-1～3）は、図 6（a）および図 8（a）から分かるように、R u 錯体の含有量を小さくしても高い直線性が得られている。このような結果は、5 秒値であるか 10 秒値であるかを問わず、またグルコース濃度が高い濃度域（ $600\sim1000\text{ mg/dL}$ ）においても得られていることから、C y G D H と R u

錯体とを組み合わせた系は、反応速度が大きい ( $K_m$ が小さい) といえることができる。表3～表8から分かるように、C y G D HとR u錯体とを組み合わせた系は、C. V. が小さく、再現性に優れている。以上の結果をまとめると、C y G D HとR u錯体とを組み合わせた系は、5秒値と10秒値の双方においてR uの濃度を変化させても、直線性、再現性に大きな変化は無く、5秒で十分反応が終了し、グルコースを定量できるといえる。

#### 【0079】

$\alpha$  G D HとR u錯体とを組み合わせたグルコースセンサ (B-1～3) では、図6 (b) および図8 (b) から分かるように、R u錯体の含有量を小さく (2 wt %) した場合には、グルコース濃度が高い濃度域 (600～1000 mg/dL) で直線性が若干乱れているものの、基本的には、C y G D HとR u錯体とを組み合わせた系と同様な結果が得られている。そのため、 $\alpha$  G D HとR u錯体とを組み合わせた系についても、反応速度が大きいといえ、また表3～表8から分かるように、基本的には再現性に優れているといえる。したがって、 $\alpha$  G D HとR u錯体とを組み合わせた系についても、5秒で十分反応が終了し、グルコースを定量できるといえる。

#### 【0080】

これに対して、R uとP Q Q G D Hとを組み合わせたグルコースセンサ (C-1～3, D-1～3) では、図6 (c), (d) および図8 (c), (d) から分かるように、直線性を確保するためには、R u錯体および酸化還元酵素の含有量を大きくする必要がある。この場合、試薬層の総量が大きくなるため、微量検体 (0.3  $\mu$ L) を測定するためにキャピラリサイズを小さくする方向性には馴染まず、実用的でない。

#### 【0081】

電子伝達物質としてF e r r iを用いたグルコースセンサ (E-1～3, F-1～3, G-1～3, H-1～3) は、図7および図9から明らかなように、直線性が悪い。しかも、図7 (c), (d) および図9 (c), (d) から分かるように、酸化還元酵素としてP Q Q G D Hを使用したグルコースセンサG-1～3, H-1～3では、酵素量を多く (20 U) しても、R uとC y G D Hとを組

み合わせた系には、反応速度において及ばず、実用的でないといえる。また、表 3～表 9 から分かるように、F e r r i 自体の溶解性の悪さからか、全体的に再現性が悪く、この点からも実用性を欠いているといえる。

#### 【0082】

図 10 (a)～(c) に示したように、本案センサ 1～3 では、測定時間を長く設定するにつれて、H c t の影響が小さくなり、検体の供給開始から 10 秒後では殆どに H c t の影響を受けていない。一方、キャピラリ容積が小さく、スペーサの厚みが小さい本案センサほど、H c t の影響が小さくなっている。このことから、H c t の影響を抑制するためには、スペーサの厚みを小さくして、センサの電極表面でグルコース反応を起こさせるのが有用であるといえる。

#### 【0083】

これに対して、比較センサでは、検体の供給開始から 30 秒後においても、H c t 値が大きい場合には、H c t の影響を大きく受けており、その B i a s 値は、本案センサの 5 秒値に同等程度である。したがって、R u 錯体と C y G D H とを組み合わせた本案センサ 1～3 は、検体量が少なくても短い時間で測定可能であり、しかも H c t の影響を受けにくい。そのため、R u 錯体と C y G D H とを組み合わせた場合には、検体量の減量および想定時間の短縮が可能であり、H c t の影響を受けにくいグルコースセンサの構築が可能となる。

#### 【0084】

以上のことから、微量検体（たとえば  $0.3 \mu\text{L}$ ）にて短時間で血糖を測定する場合においては、R u と C y G D H とを組み合わせは、測定レンジ、再現性、測定時間、H c t の影響を回避する点において、優位な組み合わせであるといえる。

#### 【0085】

##### 【発明の効果】

本願発明では、R u 錯体と特定のグルコース脱水素酵素（チトクロム C が結合されたもの、またはブルクホルデリア属に属する微生物に由来するもの）とを組み合わせた反応系を構築することにより、測定レンジを大きく確保しつつ、短時間かつ精度良く、ヘマトクリットの影響をさほど受けることなく、微量なグルコ

ース溶液を測定できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本願発明に係るグルコースセンサおよびこれを装着して使用するグルコース濃度測定装置の一例の概略構成を示す模式図である。

【図 2】

グルコースセンサの一例を示す全体斜視図である。

【図 3】

図 2 のグルコースセンサの分解斜視図である。

【図 4】

グルコース濃度の測定において、第 1 および第 2 電極間に印加する電圧値、および応答電流値の経時的変化の一例を示すグラフである。

【図 5】

グルコース濃度の測定において、第 1 および第 2 電極間に印加する電圧値、および応答電流値の経時的変化の他の例を示すグラフである。

【図 6】

Ru 錯体を用いて試薬層を構成した場合において、グルコース濃度と反応開始 5 秒後の応答電流値との関係を示すグラフである。

【図 7】

Ferric を用いて試薬層を構成した場合において、グルコース濃度と反応開始 5 秒後の応答電流値との関係を示すグラフである。

【図 8】

Ru 錯体を用いて試薬層を構成した場合において、グルコース濃度と反応開始 10 秒後の応答電流値との関係を示すグラフである。

【図 9】

Ferric を用いて試薬層を構成した場合において、グルコース濃度と反応開始 10 秒後の応答電流値との関係を示すグラフである。

【図 10】

Hct の影響を、反応開始から特定時間経過後の Bias (Hct 42% 基準

）として評価したグラフである。

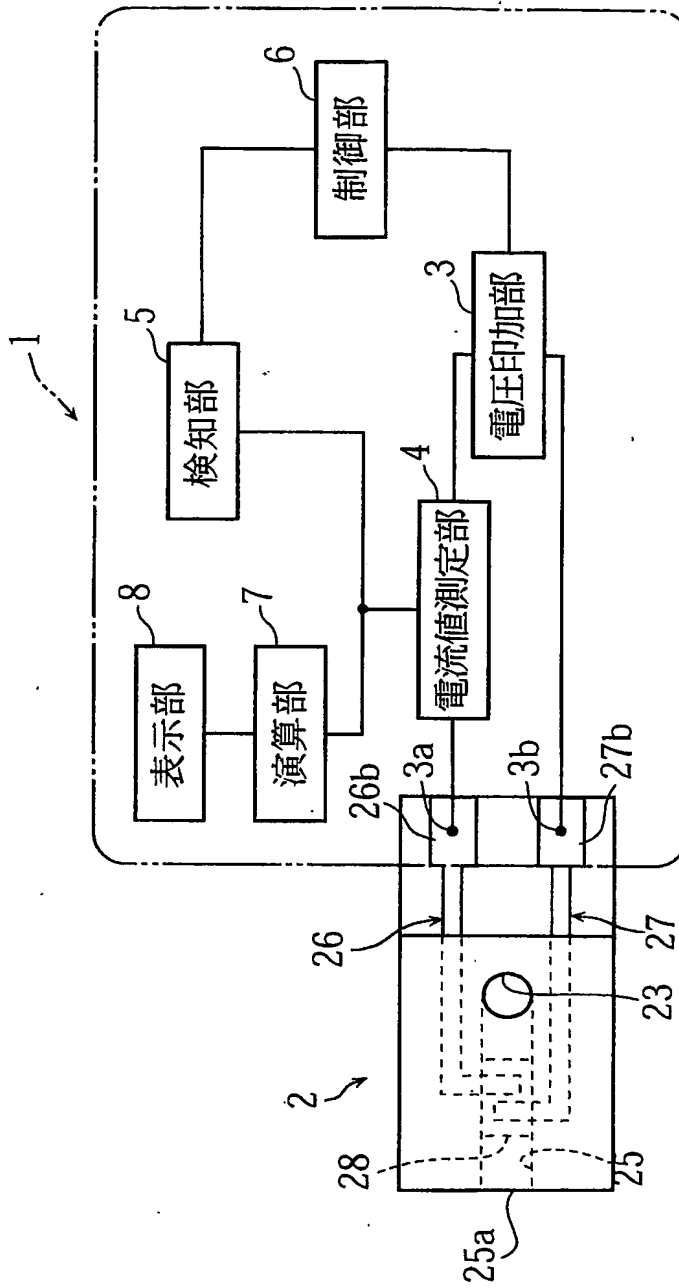
【符号の説明】

- 2    グルコースセンサ
- 2 2    基板
- 2 5    キャピラリ（液保持空間）
- 2 6    第1電極
- 2 7    第2電極
- 2 8    試薬層

【書類名】

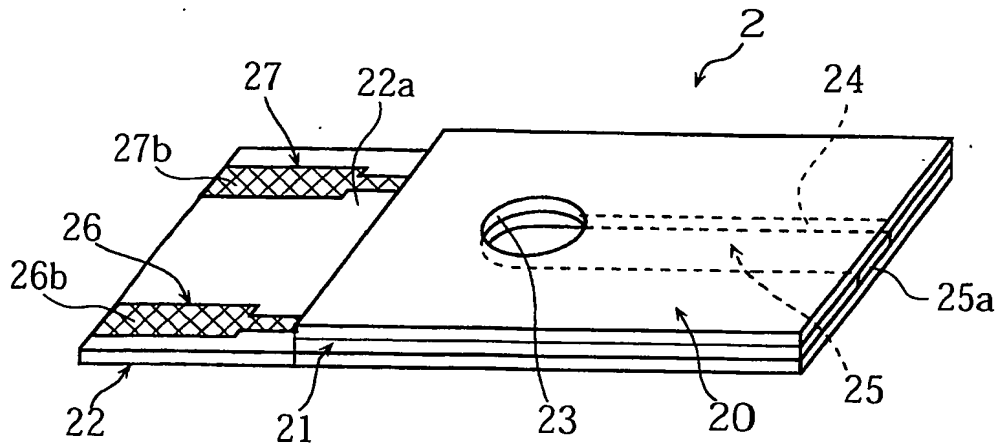
図面

【図 1】

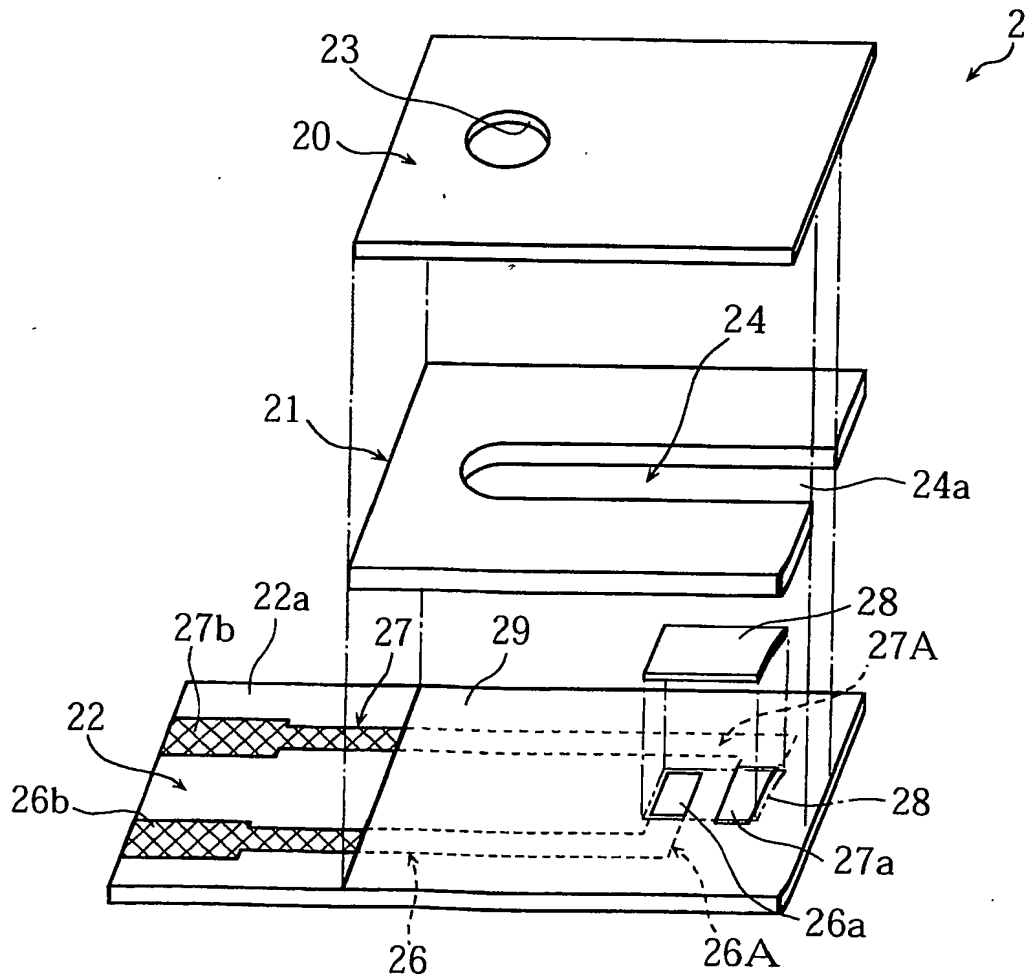




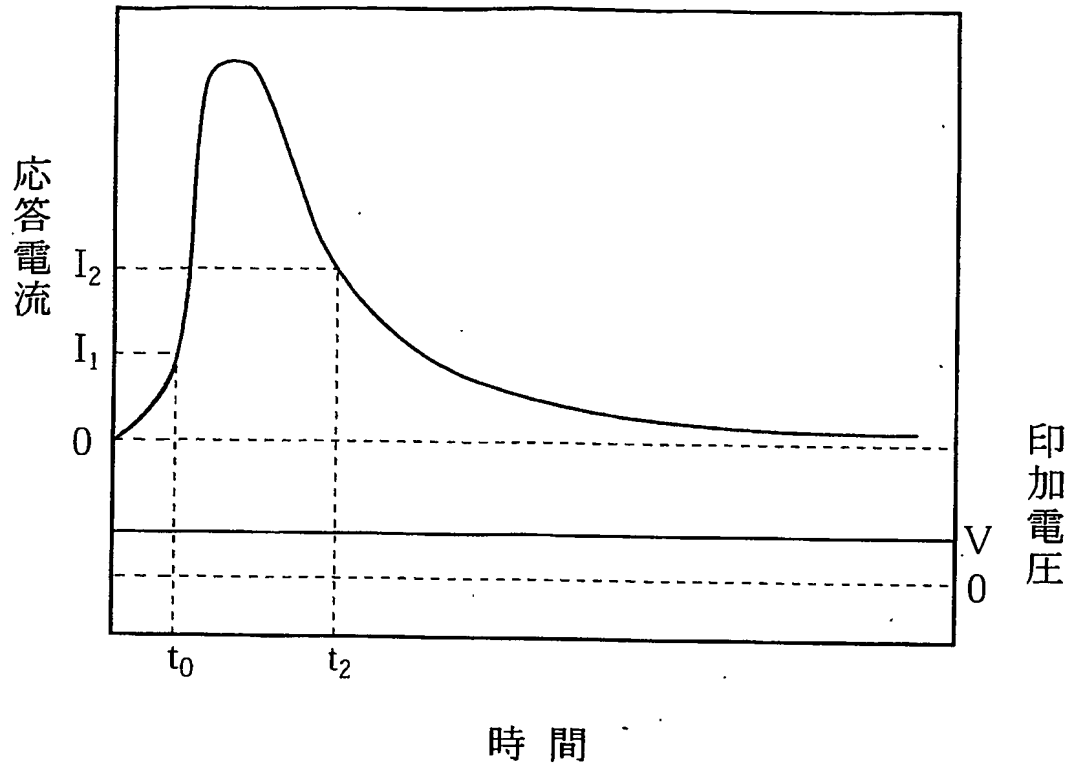
【図 2】



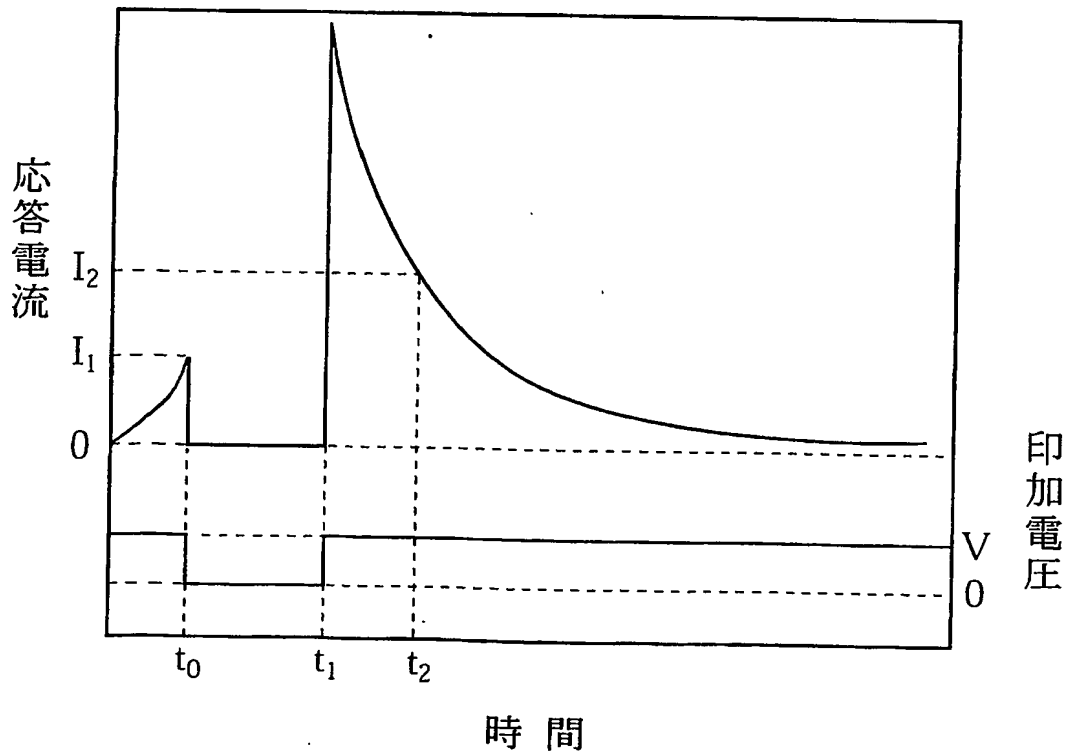
【図 3】



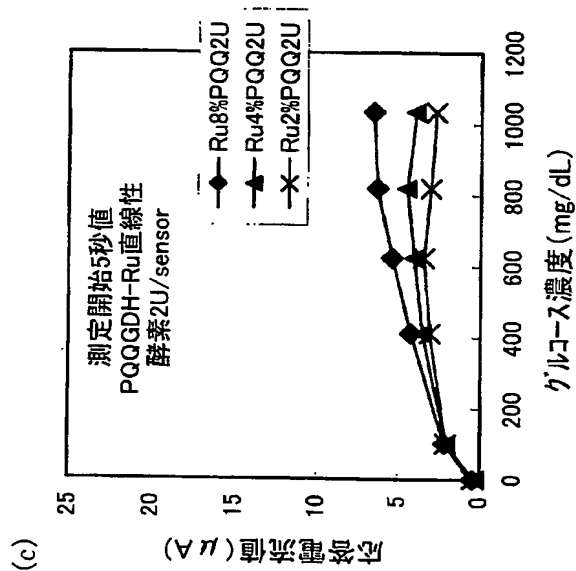
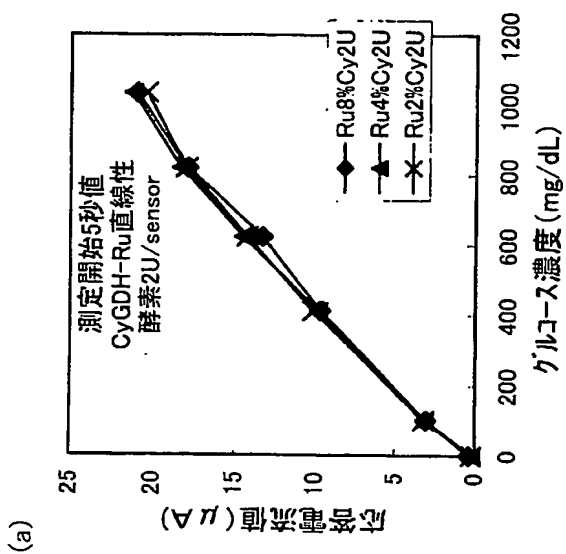
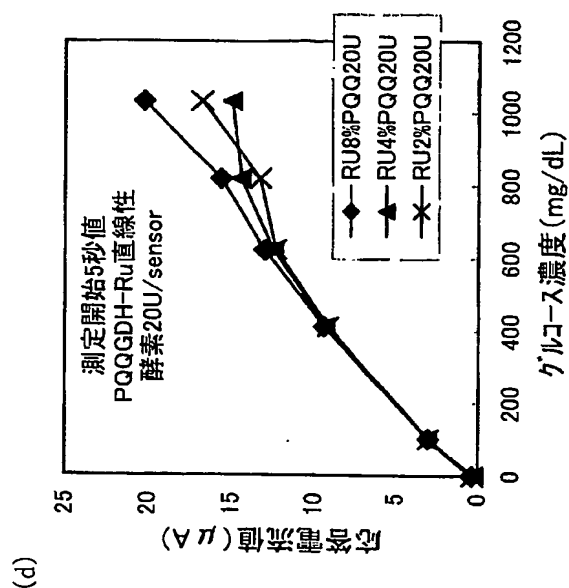
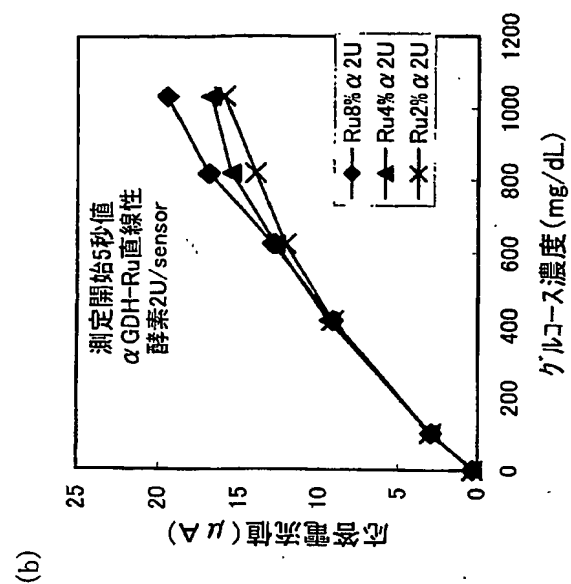
【図 4】



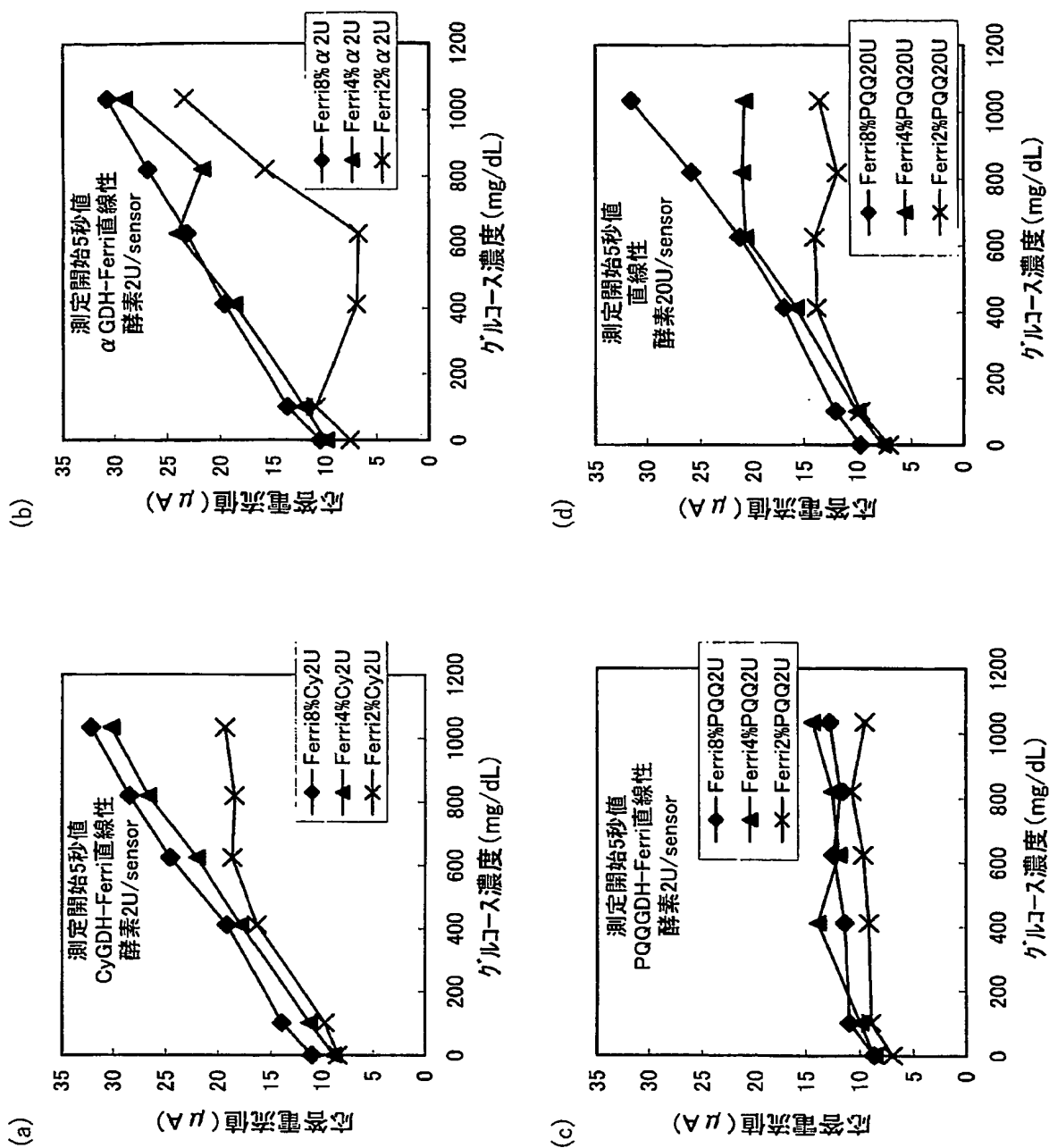
【図 5】



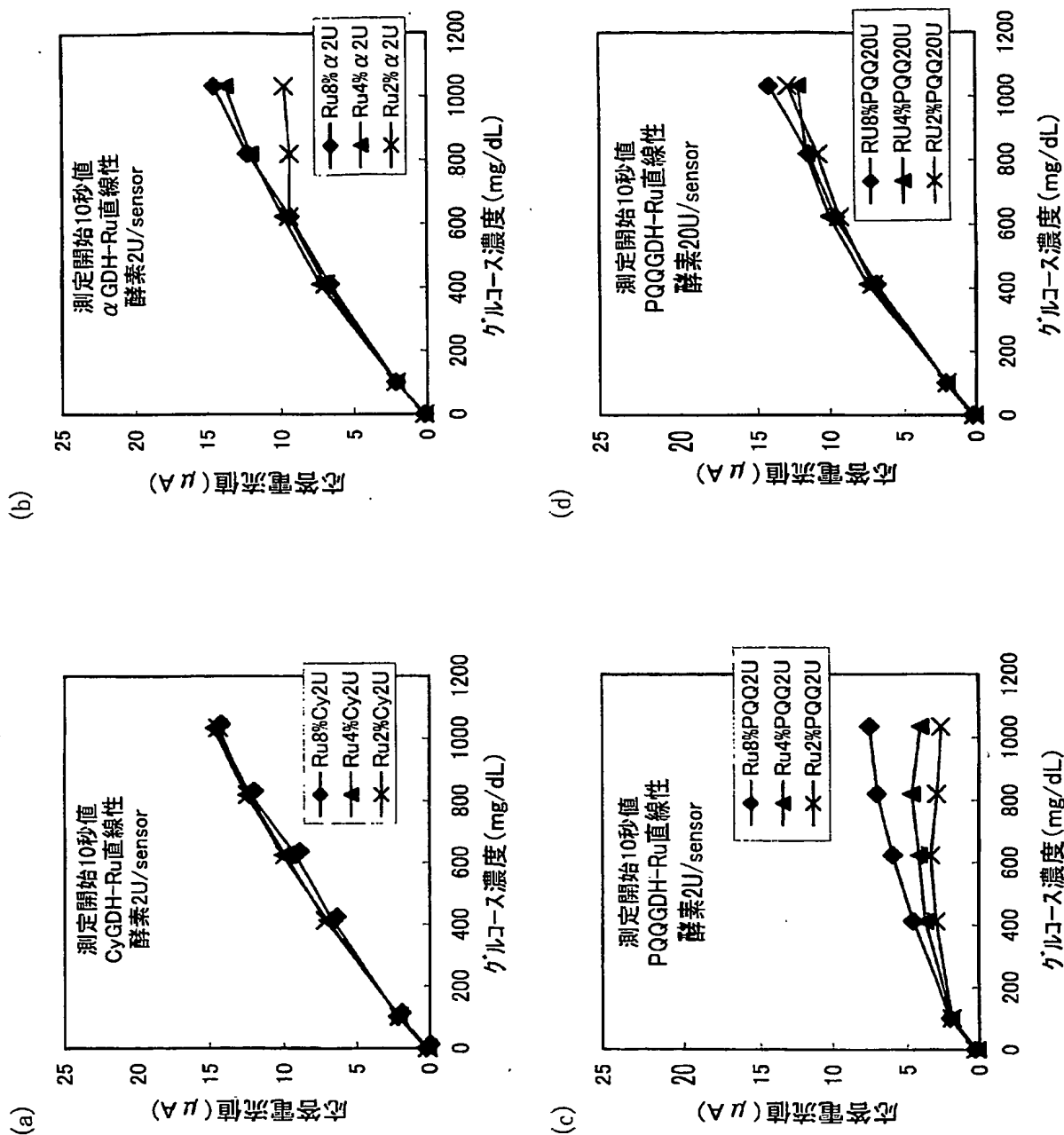
【図6】



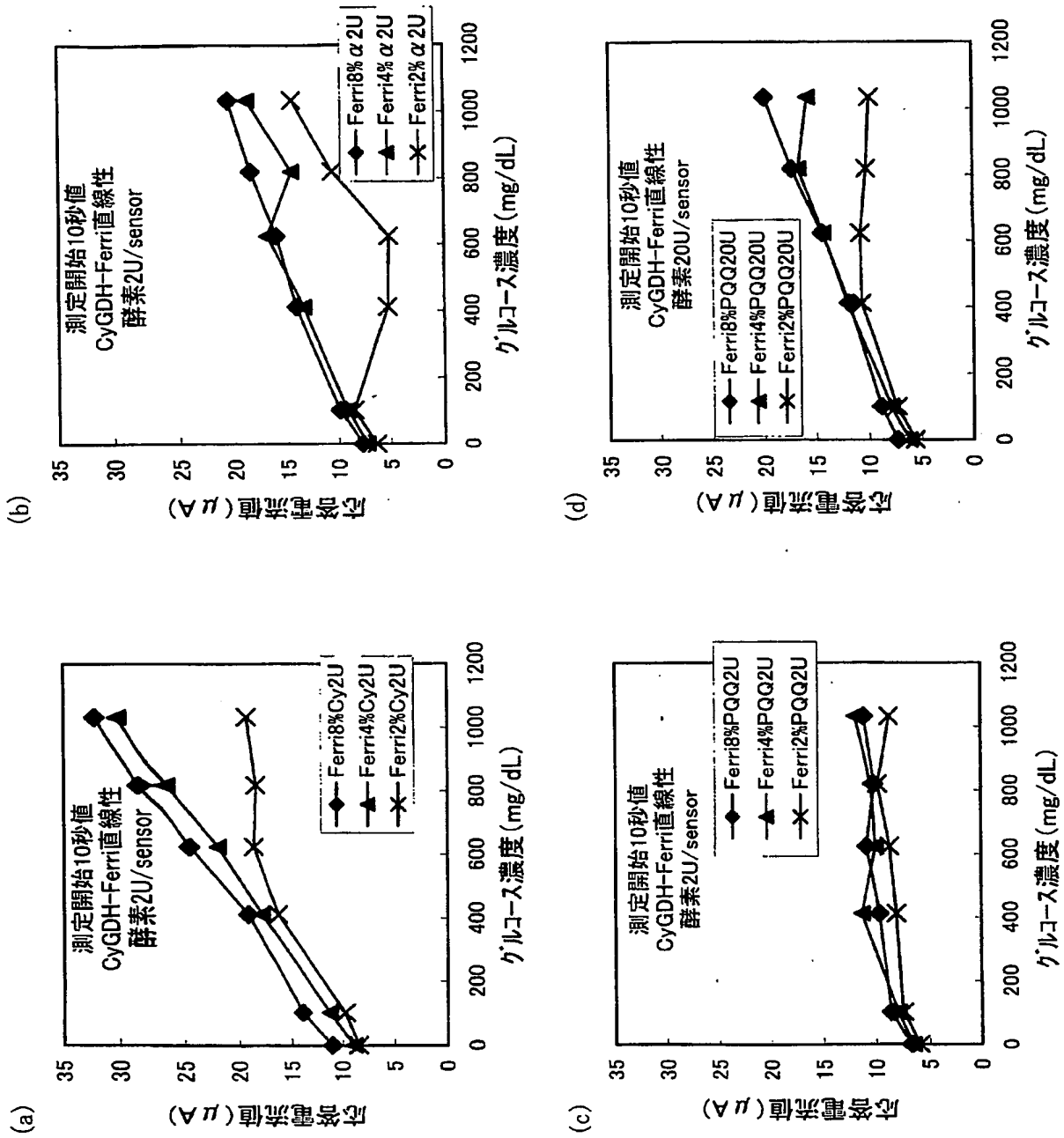
【図 7】



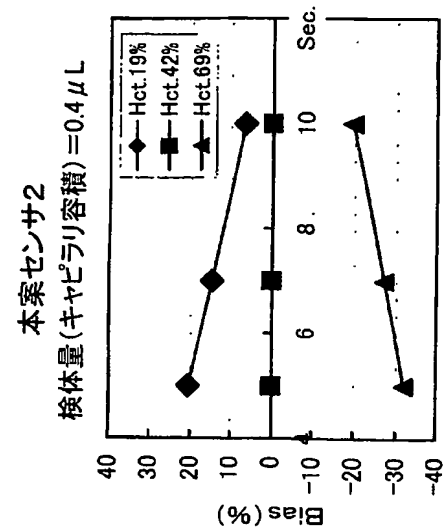
【図8】



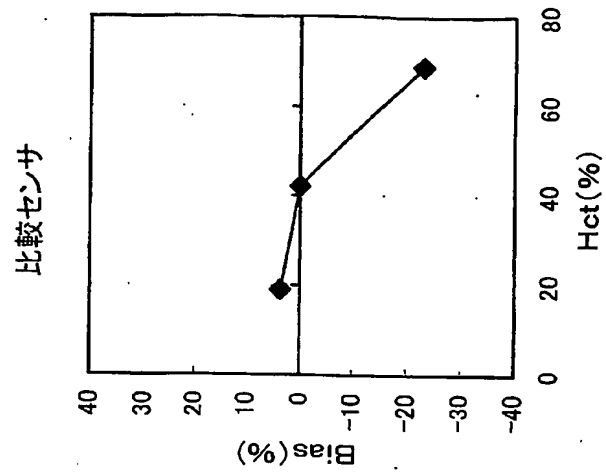
【図 9】



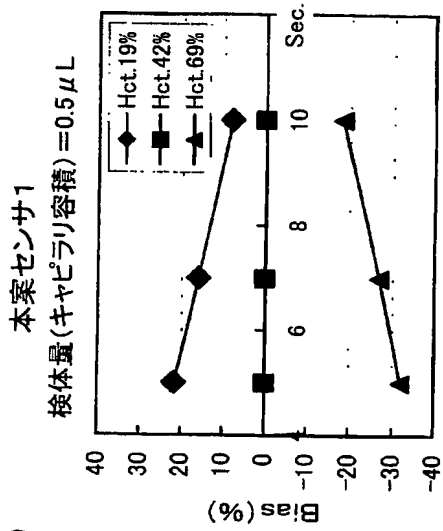
【図 10】



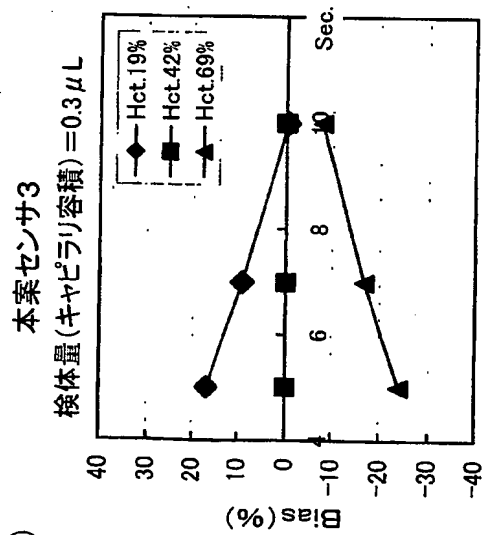
(b)



(d)



(a)



(c)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 測定レンジを大きく確保しつつ、短時間かつ精度良く、微量検体を測定できるようにする。

【解決手段】 酵素と電子伝達物質とを含む反応系を利用してグルコース濃度を測定する方法において、酵素として、チトクロムCが結合されたグルコース脱水素酵素またはブルクホルデリア属に属する微生物に由来のグルコース脱水素酵素を使用し、電子伝達物質として、Ru化合物を使用する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 2 - 1 7 6 3 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 4 1 8 9 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

氏 名

株式会社京都第一科学

2. 変更年月日

2 0 0 0 年 6 月 1 2 日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

氏 名

アークレイ株式会社